

ST/FR 03/03188
10/532663

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 26 MAR 2004

WIPO

PC

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 09 MARS 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
NON CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



BREVET D'INVENTION

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livreVI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 28 oct. 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0213474 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 28 OCT. 2002	Alain MICHELET CABINET HARLE ET PHELIP 7 rue de Madrid 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: N771FR	

1 NATURE DE LA DEMANDE			
Demande de brevet			
2 TITRE DE L'INVENTION			
PROCÉDE POUR INSERER UN ACIDE NUCLEIQUE D'INTERET DANS UNE CELLULE PROCARYOTE OU EUCARYOTE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE.			
3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE			
Pays ou organisation Date N°			
4-1 DEMANDEUR			
Nom		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Rue		3 rue Michel Ange	
Code postal et ville		75794 PARIS cedex 16	
Pays		France	
Nationalité		France	
Forme juridique		Etablissement public	
5A MANDATAIRE			
Nom		MICHELET	
Prénom		Alain	
Qualité		CPI: bm [92-1176	
Cabinet ou Société		CABINET HARLE ET PHELIP	
Rue		7 rue de Madrid	
Code postal et ville		75008 PARIS	
N° de téléphone		33 1 53 04 64 64	
N° de télécopie		33 1 53 04 64 00	
Courrier électronique		cabinet@harle.fr	
6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS			
Fichier électronique		Pages	Détails
Description	desc.pdf	22	
Revendications	V	3	23
Dessins		1	1 fig., 3 ex.
Abrégé	V	1	
Listage de séquences			
Rapport de recherche			
8 RAPPORT DE RECHERCHE			
Etablissement immédiat			

9 REDEVANCES JOINTES	Devise	Taux	Coûté	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	35.00	1	35.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	13.00	195.00
Total à acquitter	EURO			550.00
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE				
Signé par	Alain MICHELET			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt dans une localisation choisie d'un acide nucléique génomique présent dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote.

ETAT DE LA TECHNIQUE

10 La mise au point de techniques efficaces et reproductibles en vue de l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt à un endroit choisi de l'ADN d'un chromosome fait actuellement l'objet de nombreux travaux, en particulier de travaux relatifs à la mise au point de techniques de thérapies géniques cellulaires somatiques, qui visent à prévenir ou traiter des pathologies humaines ou animales associées à un déficit d'origine génétique.

15 Ces techniques sont utiles pour traiter des déficits génétiques provoqués par la mutation du gène sauvage initial. On peut citer par exemple le gène *cfr* dont certaines mutations provoquent la maladie de la mucoviscidose, aussi désignée fibrose kystique.

20 L'insertion ciblée d'un acide nucléique au sein d'un ADN chromosomique est également utile dans le cadre de procédés de production d'animaux transgéniques modèles, notamment afin d'étudier les effets physiologiques de la surexpression (animaux « knock-in ») ou au contraire du blocage de l'expression (animaux « knock-out ») d'un gène d'intérêt, notamment en vue de mettre au point de nouveaux médicaments.

25 Différentes techniques d'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt à un endroit précis et prédéterminé de l'ADN d'un chromosome sont d'ores et déjà disponibles. De nombreuses techniques ont été détaillées notamment dans un article de revue de CAPECCHI (1989). Par exemple, on a décrit des techniques d'insertion ciblée d'ADN par recombinaison homologue par co-transformation de cellules avec deux vecteurs distincts, respectivement un vecteur contenant un gène de sélection et un vecteur utilisé pour la recombinaison homologue, ces techniques étant utilisées en particulier pour l'interruption d'un gène cible (Reid et al, 1991).

On a aussi décrit des systèmes de recombinaison homologue à deux vecteurs, respectivement (i) un premier vecteur destiné à être intégré dans le génome cible et fournissant un site unique de recombinaison homologue et (ii) un second vecteur comprenant la séquence d'intérêt à insérer au niveau du site unique de recombinaison préalablement intégré (brevet US N° 5,998, 144).

D'autres travaux concernent des systèmes de recombinaison homologue dans lesquels trois partenaires moléculaires, respectivement (i) un fragment d'ADN donneur double brin, (ii) un premier ADN de liaison double-brin et (iii) un second ADN de liaison double brin (brevet américain N° 6,207,442).

L'utilisation de vecteurs rétro-viraux pour réaliser l'insertion ciblée d'ADN par recombinaison homologue a également été décrite (brevet américain N° 6,281,000), ainsi que l'utilisation de vecteurs comprenant deux gènes marqueurs de sélection, respectivement un marqueur de sélection négative et un marqueur de sélection positive (brevet américain N° 6,284,541).

On connaît aussi des techniques de recombinaison homologue qui tirent parti de la formation d'une structure du type triple hélice d'ADN à l'endroit du chromosome préalablement choisi pour l'insertion de l'ADN d'intérêt, comme cela est décrit notamment dans les brevets américains US N° 5,962,426 et US N° 6,303,376.

Toutefois, la pratique des techniques de recombinaison homologue ci-dessus illustre le fait que les séquences d'ADN d'intérêt exogènes transférées dans des cellules, en particulier des cellules eucaryotes, ne subissent des événements de recombinaison homologue, avec les séquences endogènes homologues de l'hôte cellulaire, qu'à des fréquences très basses de recombinaison, ce qui nécessite le recours à la transfection, puis la sélection, d'un très grand nombre de cellules afin de produire au moins un clone de cellules recombinantes pour lequel la séquence d'ADN d'intérêt a effectivement été insérée à l'endroit choisi du génome.

De plus, pour certaines des techniques ci-dessus, le ou les vecteurs d'ADN utilisés pour réaliser la recombinaison homologue n'est (ne sont) pas éliminé (s) de l'hôte cellulaire, ce qui entraîne de nombreux inconvénients, notamment du fait que ces vecteurs d'ADN comprennent en général des

gènes de sélection consistant en des gènes de résistance à divers antibiotiques, susceptibles de diffuser subséquemment dans l'hôte procaryote ou eucaryote recombiné .

De façon générale, les techniques de ciblage de gènes dans les organismes eucaryotes supérieurs se heurtent au fait que les événements de recombinaison non homologue sont de 1000 à 100 000 fois plus fréquents que les événements de recombinaison homologue. L'absence de technique permettant d'augmenter efficacement la fréquence de recombinaison homologue a orienté les recherches vers le développement de systèmes d'enrichissement en clones recombinants homologues basés sur des sélections génétiques dont l'objet est d'éliminer les clones recombinants chez lesquels se sont réalisés des événements de recombinaison non homologue. Cependant, du fait de la fréquence très faible des événements de recombinaison homologue, et malgré la forte pression de sélection exercée sur les clones cellulaires recombinants, il est souvent très difficile d'obtenir les clones recombinants recherchés, a fortiori de manière reproductible.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Le demandeur s'est attaché à mettre au point un procédé permettant l'insertion ciblée d'un ADN d'intérêt dans le chromosome d'une cellule, par recombinaison homologue, avec une haute fréquence des événements de recombinaison homologue, et à l'issue duquel le vecteur porteur de la séquence d'intérêt à insérer de manière ciblée, qui peut comprendre des séquences indésirables tels que des gènes de résistance aux antibiotiques, est éliminé.

Il est montré selon l'invention que la mise en contact d'un polynucléotide comprenant un acide nucléique d'intérêt avec un agent mutagène qui crée, dans ledit polynucléotide, des lésions susceptibles d'interférer avec sa réplication dans la cellule, permet l'insertion ciblée, par un événement de recombinaison homologue, de cet acide nucléique d'intérêt dans une localisation choisie dans le génome de ladite cellule, avec une haute fréquence de l'événement de recombinaison homologue.

Simultanément, les parties du polynucléotide, autres que l'acide nucléique d'intérêt qui est initialement inclus dans ce dernier, sont éliminées de la cellule hôte procaryote ou eucaryote recombinée.

Les agents mutagènes selon l'invention sont choisis préférentiellement
5 parmi les agents qui bloquent la réplication de l'ADN dans la cellule procaryote ou eucaryote et qui créent ainsi des structures recombinogènes au sein de l'ADN traité par lesdits agents mutagènes. Par structure recombinogène, on entend une ou plusieurs régions de l'ADN traité dans
10 lesquelles la structure double brin de l'ADN est affectée, par exemple par création d'un mésappariement des bases, ce qui inclut une éventuelle coupure de l'un des brins d'ADN, ces structures recombinogènes étant reconnues par les complexes enzymatiques cellulaires participant à la réparation et à la recombinaison de l'ADN.

En particulier, il est montré selon l'invention que la mise en contact
15 d'un polynucléotide comprenant un acide nucléique d'intérêt avec l'agent mutagène N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF) permettait l'insertion ciblée, par recombinaison homologue, de cet ADN d'intérêt dans une localisation choisie de l'ADN d'un chromosome contenu dans une cellule, avec une haute fréquence de l'événement de recombinaison
20 homologue.

On a aussi montré selon l'invention que la fixation des molécules de N-AcO-AAF sur le polynucléotide comprenant l'ADN d'intérêt permettait l'obtention d'événements de recombinaison homologue non réciproque dans le sens du polynucléotide vers le chromosome, avec une fréquence très
25 élevée. Cette fréquence peut être supérieure à 0,05 événements de recombinaison homologue par cellule transfectée.

L'invention a donc pour objet l'utilisation d'un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée
30 présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote.

Un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule englobe, selon l'invention, tout composé chimique naturel ou de synthèse, ou encore un rayonnement ultraviolet (UV), dont l'activité de blocage de la
35 réplication de l'ADN peut être déterminée par toute technique connue de

l'homme du métier, par exemple la technique décrite par FUCHS (1984), qui utilise l'activité exonucléase 5'→ 3' de l'ADN polymérase du phage T4, laquelle est bloquée au voisinage des bases chimiquement modifiées.

Avantageusement, l'agent mutagène est choisi parmi le N-AcO-AAF, les agents alkylants, le benzo(a)pyrene-diol-époxyde (BPDE), ou encore un rayonnement U.V.

Lorsque l'agent mutagène consiste en un rayonnement UV, l'ADN à traiter est avantageusement irradié par une source de rayons UV immédiatement avant l'utilisation de cet ADN pour transfecter les cellules. Par exemple, l'ADN peut être ajusté à la concentration de 100µg/ml dans un tampon TE (pH 8,0) puis irradié à la température de 20°C-25°C à la puissance de 1,8 J.m⁻².s⁻¹ à l'aide d'une lampe germicide, par exemple la lampe référencée G8T5 (General Electric).

Préférentiellement, l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).

Le composé N-AcO-AAF est connu dans l'état de la technique en tant qu'agent mutagène. Le composé N-AcO-AAF a notamment été utilisé dans le cadre de travaux académiques relatifs à l'étude du mécanisme de réparation de l'ADN des cellules bactériennes. Lorsque le composé N-AcO-AAF est mis en contact avec un plasmide bactérien qui est subséquentment transfecté dans des cellules d'*Escherichia coli*, on observe une induction des mécanismes intracellulaires de réparation de l'ADN, lesquels par des étapes d'excision puis d'élongation de l'ADN clivé, permettent la survie du plasmide dans les cellules de *E.coli* (Schmid et al., 1982).

Il a aussi été montré que la fréquence de certains événements de recombinaison homologue, du chromosome vers le plasmide, peut être augmentée lorsque le plasmide est préalablement traité avec le N-AcO-AAF, dans un système cellulaire *Escherichia coli*.

Ainsi, Luisi-DeLuca et al. (1984) utilisent un plasmide portant le gène lacY⁺ dans un hôte bactérien de phénotype LacY⁻. Après transformation de la cellule bactérienne par le plasmide, la majorité des bactéries transformées sont de phénotypes Lac⁻. Les transformants Lac⁻ obtenus proviennent d'un transfert de l'allèle lacY⁻ du chromosome vers le plasmide.

Il a été montré pour la première fois selon l'invention qu'un agent mutagène tel que défini ci-dessus, en particulier le composé N-AcO-AAF,

lorsqu'il est mis en contact avec un polynucléotide comprenant un ADN d'intérêt à insérer de manière ciblée dans le chromosome d'une cellule procaryote ou eucaryote, est capable d'induire un transfert de l'ADN d'intérêt dudit polynucléotide, qui peut être par exemple un plasmide, vers le chromosome, et ceci avec une fréquence très élevée des événements de recombinaison homologue non réciproques du polynucléotide vers le chromosome.

L'invention a donc également pour objet un procédé pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt inclus initialement dans un polynucléotide, au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

- a) mettre en contact le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt avec un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule ;
- b) transfecter des cellules procaryotes ou eucaryotes avec le polynucléotide tel qu'obtenu à la fin de l'étape a) ;
- c) sélectionner les cellules procaryotes ou eucaryotes pour lesquelles l'acide nucléique d'intérêt a été intégré dans la séquence nucléotidique prédéterminée.

De préférence, le procédé ci-dessus comprend en outre l'étape suivante :

- d) sélectionner, parmi les cellules procaryotes ou eucaryotes sélectionnées à l'étape c), les cellules dans lesquelles les séquences du polynucléotide, autres que celles de l'acide nucléique d'intérêt, ont été éliminées.

Avantageusement, le composé N-AcO-AAF est préparé par synthèse chimique à partir du Nitrofluorène, selon des techniques connues de l'homme du métier, comme par exemple la technique décrite par LEFEVRE et al. (1978).

Le Nitrofluorène de départ, ainsi que le composé N-AcO-AAF final, peuvent être obtenus notamment auprès de la Société AMERSHAM.

On a montré selon l'invention, que la fréquence des événements de recombinaison homologue non réciproque du polynucléotide, par exemple un plasmide, vers le chromosome, augmente avec un nombre croissant de

lésions ou de bases chimiquement modifiées provoquées par l'agent mutagène dans ledit polynucléotide.

Par exemple, on a montré selon l'invention que la fréquence des événements de recombinaison homologue non réciproque du polynucléotide, par exemple un plasmide, vers le chromosome, augmente avec un nombre croissant de molécules d'agent mutagène, comme le N-AcO-AAF, fixés sur ledit polynucléotide.

Ainsi, la fréquence d'événements de recombinaison homologue passe de $5,61 \times 10^{-4}$ pour dix molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt, à plus de 600×10^{-4} pour 67 molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt.

Des fréquences accrues de recombinaison homologue non réciproque du polynucléotide vers le chromosome peuvent être obtenues avec des rapports encore plus élevés de lésions de l'ADN ou de nombre de molécules d'agent mutagène, comme le N-AcO-AAF, par molécule dudit polynucléotide.

Ainsi, le nombre de lésions de l'ADN ou de molécules d'agent mutagène par molécule dudit polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt peut dépasser 100/1.

Avantageusement, à l'étape a) du procédé, la concentration finale de l'agent mutagène utilisé est adaptée à la fixation d'au moins 10 molécules d'agent mutagène par molécule du polynucléotide. Préférentiellement, la concentration finale de l'agent mutagène utilisé est adaptée à la fixation d'au moins 50 molécules de cet agent mutagène par molécule du polynucléotide.

Selon l'invention, le nombre de molécules de l'agent mutagène, en particulier de N-AcO-AAF, par molécule du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt est au minimum de 10/1 et peut aller au-delà de 100/1, par exemple jusqu'à 200/1.

Avantageusement, le nombre de molécules de l'agent mutagène par molécule du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt est compris entre 10/1 et 100/1, le rapport optimal nombre de molécules de l'agent mutagène/molécule dudit polynucléotide étant choisi en fonction de la fréquence de recombinaison homologue non réciproque du polynucléotide vers le chromosome désirée.

Afin d'obtenir le rapport molaire désiré agent mutagène/polynucléotide, l'homme du métier peut faire varier (i) les concentrations relatives dudit agent mutagène et dudit polynucléotide qui sont mis en contact à l'étape a) du procédé et/ou (ii) la durée de l'étape a) de mise en contact dudit agent mutagène avec ledit polynucléotide.

De préférence, pour un polynucléotide donné, d'une taille donnée, on modifie le rapport molaire agent mutagène/polynucléotide en faisant varier la durée de l'étape a) de mise en contact entre ledit agent mutagène et ledit polynucléotide.

De même, pour l'obtention d'un rapport molaire agent mutagène/polynucléotide donné, on fait varier la durée de l'étape a) en fonction de la taille du polynucléotide considéré, la durée de l'étape a) étant d'autant plus longue que la taille du polynucléotide est grande.

L'homme du métier peut aisément déterminer si, à la fin de l'étape a) du procédé, le rapport molaire agent mutagène/polynucléotide désiré a été atteint, selon des techniques conventionnelles.

Par exemple, à la fin de l'étape a), une fraction aliquote du mélange agent mutagène/polynucléotide est prélevée et les molécules libres d'agent mutagène sont éliminées, par exemple par précipitation de l'ADN puis filtration sur filtre de nitrocellulose.

Puis, on détermine respectivement le nombre de moles du polynucléotide et le nombre de moles d'agent mutagène fixées sur ledit polynucléotide afin d'établir le rapport agent mutagène/polynucléotide qui a été atteint.

Le nombre de moles du polynucléotide contenues dans la fraction aliquote peut être classiquement déterminé par spectrophotométrie UV à la longueur d'onde de 260 nanomètres.

Le nombre de moles de l'agent mutagène fixées sur ce polynucléotide peut être déterminé par mesure de radioactivité, par exemple lorsque, pour les essais, on a utilisé un agent mutagène marqué avec un isotope radioactif, tel que $^3\text{[H]}$.

Une molécule d'agent mutagène se fixe sur une base du polynucléotide. Le résultat peut donc être exprimé en pourcentage de bases du polynucléotide qui ont été modifiées par l'agent mutagène.

Par exemple, on a déterminé selon l'invention, lorsqu'on a traité un plasmide d'une longueur de 5000 paires de bases, que les rapports molaires agent mutagène/polynucléotide étaient respectivement de 13 (0,26% de bases modifiées) pour une durée de l'étape a) de 4 minutes, 28 (0,36% de bases modifiées) pour une durée de 8 minutes, et 56 (1,12% de bases modifiées) pour une durée de 20 minutes, après mise en contact de 60 µg du polynucléotide en solution avec 1,2 µg de N-AcO-AAF.

Pour la mise en œuvre de l'étape a) du procédé, le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt est avantageusement en suspension dans un tampon salin, de préférence un tampon citrate, éventuellement additionné d'éthanol.

L'agent mutagène est en solution dans un solvant approprié. Dans le cas du N-AcO-AAF, on utilise de préférence l'éthanol.

Pour un essai donné, l'homme du métier adaptera le rapport molaire agent mutagène/polynucléotide, par de simples essais de routine, jusqu'à l'obtention de la fréquence optimale d'évènements de recombinaison homologue recherchée.

De manière surprenante, on a montré que le procédé selon l'invention permettait l'insertion ciblée d'acides nucléiques de grande taille, supérieure à 1,5 kilobases. Cette caractéristique du procédé de l'invention est particulièrement avantageuse, car elle permet notamment l'insertion ciblée de séquences génomiques de gènes entiers, avec toutes les séquences fonctionnelles présentes dans les introns des gènes, qui ne sont pas retrouvées par exemple dans l'ADNc correspondant.

De manière générale, l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le génome de la cellule procaryote ou eucaryote inclus dans le polynucléotide comprend au moins, respectivement à son extrémité 5' et à son extrémité 3', des séquences nucléotidiques ayant un haut degré d'identité, de préférence supérieur à 99,5%, et encore mieux supérieur à 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% d'identité, sans lacune ou « gap », avec les séquences correspondantes de l'ADN cible contenu dans le chromosome. De préférence, ces séquences localisées respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'acide nucléique d'intérêt sont identiques aux séquences des extrémités respectivement 5' et 3' de la séquence cible visée qui est présente dans le chromosome, afin d'accroître encore la fréquence des évènements de

recombinaison homologue. Les séquences flanquantes localisées respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le polynucléotide utilisé pour la transfection comprennent au moins 100 paires de base, de préférence au moins 300 paires de base successives identiques aux séquences cibles correspondantes dans le chromosome. Plus la taille des séquences flanquantes 5' et 3' est grande et plus la probabilité d'obtention d'une haute fréquence de recombinaison homologue est élevée. De manière générale, on préfère des séquences flanquantes ayant de 300 à 1500 paires de bases identiques avec les séquences cibles correspondantes natives dans le chromosome.

Des séquences flanquantes homologues d'une longueur supérieure à 1500 paires de bases peuvent aussi être utilisées.

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré du procédé, l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le génome, qui est inclus dans le polynucléotide, comprend une séquence marqueur de sélection. Préférentiellement, la séquence nucléotidique marqueur de sélection consiste en un gène marqueur de sélection qui s'exprime dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote après l'insertion ciblée, par recombinaison homologue, dudit acide nucléique d'intérêt à l'endroit choisi du génome. Avantageusement, le gène marqueur de sélection est choisi parmi :

a) les gènes marqueurs de sélection fonctionnels chez *E. coli* , tels que les gènes de résistance à l'ampicilline, la tétracycline, la kanamycine, le chloramphénicol ;

b) les gènes marqueurs fonctionnels dans les cellules de mammifères, tels que les gènes de résistance à la néomycine ou à la zéocine.

c) les gènes marqueurs codant une protéine fluorescente telle qu'une GFP (« Green Fluorescent Protein ») ou YFP (« Yellow Fluorescent Protein »).

Pour choisir un gène marqueur de sélection approprié, l'homme du métier se référera avantageusement à l'ouvrage de Sambrook et al. (2001).

Le gène marqueur de sélection inclus dans l'acide nucléique d'intérêt permet ainsi aisément de réaliser l'étape c) de sélection du procédé selon l'invention.

En effet, la séquence marqueur de sélection incluse dans l'acide nucléique d'intérêt rend aisée la sélection des clones de cellules procaryotes

ou eucaryotes initialement transfectées avec le polynucléotide comprenant ledit acide nucléique d'intérêt, lesquelles cellules ont intégré, par recombinaison homologue, ledit acide nucléique d'intérêt, dans la localisation choisie de leur génome. L'événement de recombinaison homologue non
 5 réciproque du polynucléotide vers le chromosome peut ainsi être détecté par l'observation du phénotype des cellules procaryotes ou eucaryotes recombinées, ledit phénotype étant conféré par l'expression du gène marqueur, par exemple pour la production d'une protéine marqueur codée par le gène marqueur. La protéine marqueur peut être une protéine de
 10 résistance à un antibiotique ou encore une protéine fluorescente.

Selon un premier aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt qui est contenu dans le polynucléotide vecteur comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine d'intérêt thérapeutique. La protéine d'intérêt thérapeutique peut être de toute nature. Il peut s'agir par exemple d'une
 15 protéine choisie parmi les cytokines, les hormones ou encore les facteurs de croissance.

Parmi les cytokines, on peut citer notamment les Interleukines, tels que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, ou encore d'autres facteurs cytokiniques tels que MG-CSF.

20 Parmi les hormones, on peut citer notamment la LHRH. Parmi les facteurs de croissance, on peut citer notamment l'hormone de croissance humaine.

La protéine d'intérêt thérapeutique peut également être une protéine ou un peptide antigénique susceptible, lorsqu'il est présenté aux cellules du
 25 système immunitaire, d'induire la production d'anticorps à l'encontre d'un antigène, par exemple un antigène dérivé d'une bactérie ou d'un virus pathogène, ou encore induire la production de lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques d'un antigène dérivé d'un organisme pathogène, tel qu'un rétrovirus comme le VIH-1 ou le VIH-2 ou le virus de l'hépatite virale, ou
 30 encore de lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques d'antigènes tumoraux.

De préférence, selon ce premier aspect préféré de l'acide nucléique d'intérêt, le cadre de lecture ouvert code pour une protéine d'intérêt thérapeutique dont une surexpression est recherchée dans la cellule hôte.

Selon un second aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt comprend
 35 un cadre de lecture ouvert interrompu par une séquence nucléotidique

hétérologue. Ce second aspect préféré de l'invention est mis en œuvre principalement lorsque l'insertion ciblée de l'acide nucléique d'intérêt vise à remplacer, dans le chromosome cellulaire, au moins une partie de la séquence d'un gène par ledit acide nucléique d'intérêt, afin d'interrompre la
 5 séquence sauvage native dudit gène dans le chromosome et bloquer ainsi son expression. Un tel acide nucléique comprend au moins, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', (i) une première séquence nucléotidique identique à une séquence du gène cible présente dans le chromosome, (ii) la séquence nucléotidique hétérologue et (iii) une seconde séquence nucléotidique
 10 identique à une seconde séquence du gène cible dans le chromosome. Les séquences nucléotidiques (i) et (ii), du fait qu'elles sont identiques à des séquences correspondantes dans le chromosome, permettent de cibler l'insertion de l'acide nucléique d'intérêt dans ledit gène.

Selon l'invention, la séquence nucléotidique hétérologue (ii) consiste
 15 en une séquence nucléotidique qui n'est pas naturellement présente dans l'ADN cible visé.

On utilisera en particulier ce second aspect préféré de l'acide nucléique d'intérêt de l'invention pour transfecter des cellules souches embryonnaires de mammifères non humains, dans un procédé de production
 20 d'animaux transgéniques dans lesquels le gène cible est interrompu et bloqué dans son expression (animaux knock-out).

Selon ce second aspect préféré, la séquence nucléotidique hétérologue (ii) peut être le gène marqueur défini précédemment, tel qu'un gène codant pour une protéine de résistance aux antibiotiques ou encore
 25 une toute autre protéine détectable, telle qu'une protéine fluorescente comme la GFP (« Green fluorescent protein ») ou encore YFP (« Yellow fluorescent protein »), bien connues de l'homme du métier.

Selon un troisième aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt code pour un ARN antisens. On mettra en œuvre ce troisième aspect préféré de
 30 l'acide nucléique d'intérêt lorsque l'objectif recherché est d'inhiber l'expression d'une protéine codée par un gène cible, l'ARN antisens ainsi produit hybridant spécifiquement avec l'ARN messager constituant le produit de transcription du gène dont l'inhibition de l'expression est recherchée.

Selon un quatrième aspect préféré, le procédé selon l'invention est
 35 utilisé pour introduire une ou plusieurs mutations dans une séquence

génomique d'une cellule procaryote ou eucaryote, par exemple une ou plusieurs mutations ponctuelles correspondant chacune à la substitution d'une base dans la séquence génomique ciblée initiale de la cellule procaryote ou eucaryote. Selon ce quatrième aspect préféré, l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le polynucléotide possède une séquence nucléotidique identique à celle de la séquence génomique ciblée, à l'exception de la ou des bases substituées.

De préférence, selon ce quatrième aspect préféré, les bases hétérologues par rapport à la séquence cible du génome cellulaire, qui sont incluses dans l'acide nucléique d'intérêt, sont avantageusement localisées à proximité de la séquence marqueur de sélection également incluse dans l'acide nucléique d'intérêt.

De manière tout à fait préférée, l'acide nucléique d'intérêt comprend, selon ce quatrième mode de réalisation, de 1 à 10 bases substituées, distinctes des bases correspondantes de l'ADN cible visé.

Ce quatrième mode de réalisation préféré est appliqué notamment pour corriger ou au contraire introduire des mutations spécifiques, de manière ciblée, dans des localisations prédéterminées du génome cellulaire, par exemple dans des procédés d'obtention d'animaux transgéniques de type « knock-in ».

Préférentiellement, l'acide nucléique d'intérêt inclus dans le polynucléotide comprend de plus une séquence nucléotidique à fonction de promoteur, fonctionnelle dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie, sous le contrôle de laquelle est placé le cadre de lecture ouvert ou la séquence codant l'ARN antisens. Le type de promoteur sera choisi parmi les promoteurs connus, en fonction du type de cellules hôtes choisies, procaryotes ou eucaryotes.

A titre d'exemples, les promoteurs bactériens pourront être les promoteurs *LacI*, *LacZ*, les promoteurs de l'ARN polymérase du bactériophage T3 ou T7, les promoteurs PR, ou PL du phage lambda.

Les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de Sambrook et al. (1989) ou encore aux techniques décrites par Fuller et al. (1996).

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de l'invention, le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt qui est utilisé pour transfecter les cellules eucaryotes ou procaryotes, comprend une séquence nucléotidique marqueur, notamment un gène marqueur, par exemple une séquence nucléotidique codant une protéine marqueur, ladite séquence nucléotidique étant localisée, dans ledit polynucléotide, en dehors de la séquence nucléotidique de l'acide nucléique d'intérêt. Ce gène marqueur permet aisément la réalisation de l'étape d) de sélection du procédé selon l'invention. Selon ce mode de réalisation préféré de l'invention, l'expression de la protéine marqueur codée par la séquence nucléotidique localisée en dehors de la séquence de l'acide nucléique d'intérêt permet de sélectionner les cellules hôtes procaryotes ou eucaryotes qui ont été efficacement transfectées par ledit polynucléotide, par exemple un plasmide ou tout autre vecteur, mais pour lesquels l'événement de recombinaison homologue n'a pas eu lieu avec élimination des séquences nucléotidiques du polynucléotide, autres que celle de l'acide nucléique d'intérêt, par exemple avec élimination des séquences du vecteur autres que celles de l'acide nucléique d'intérêt à insérer.

Selon le procédé de l'invention, le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt est un vecteur d'ADN .

Par « vecteur d'ADN » au sens de la présente invention, on entend une molécule d'ADN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous la forme simple-brin ou double-brin.

De préférence, le vecteur d'ADN selon l'invention est un vecteur dit « de clonage » susceptible d'être répliqué dans un hôte cellulaire choisi, par exemple une cellule bactérienne et encore plus spécifiquement une cellule d'*Escherichia coli*, afin d'en produire de grandes quantités dans les cellules hôtes et qui serait utilisé comme matériel de départ pour l'insertion ciblée, dans le génome cellulaire, de l'acide nucléique d'intérêt préalablement introduit dans celui-ci.

Avantageusement, un tel vecteur comprendra, outre l'acide nucléique d'intérêt, également au moins une origine de répllication fonctionnelle dans

un hôte cellulaire choisi, par exemple dans une cellule hôte bactérienne, et encore plus spécifiquement dans des cellules de *Escherichia coli*.

Avantageusement, un tel vecteur comprend aussi la séquence d'un gène marqueur, par exemple un gène de résistance aux antibiotiques, permettant la sélection des cellules hôtes, notamment des cellules hôtes de *E.coli*, qui ont été transfectées avec ledit vecteur, ces cellules transfectées permettent, par leur culture dans un milieu de culture approprié, l'obtention de grandes quantités du vecteur.

Avantageusement, un tel vecteur comprend aussi la séquence d'un gène marqueur fonctionnel dans la cellule hôte dans laquelle on recherche l'insertion de l'acide nucléique d'intérêt par recombinaison homologue, la détection de l'expression dudit gène marqueur permettant la sélection positive ou négative des cellules hôtes ayant été effectivement transfectées avec ce vecteur.

Une illustration préférée d'un tel vecteur constituant le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt de l'invention est le vecteur pCUL-lacZ :kan dont le procédé de construction est décrit dans les exemples.

On peut notamment avoir recours à des vecteurs capables d'inclure de grandes séquences d'insertion. Dans ce mode de réalisation particulier, on utilisera de préférence des vecteurs de bactériophage, tels que les vecteurs de bactériophage P1, comme le vecteur p158, ou encore le vecteur p158/neo8 décrits par Sternberg (1992, 1994).

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs pBR322(ATCC37017) ou encore des vecteurs tels que pAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède), et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, ETATS-UNIS).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir aussi du vecteur recombinant PXP1 décrit par Nordeen SK et al. (1988).

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par Flotte et al. (1992), Samulski et al. (1989), ou encore McLaughlin BA et al. (1996).

5 Selon un autre mode de réalisation du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt, le vecteur d'ADN est un ADN linéaire double brin.

L'introduction du polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt selon l'invention dans une cellule est réalisée *in vitro*, selon les techniques bien connues de l'homme du métier pour transformer ou transfecter des
10 cellules, soit en culture primaire, soit sous la forme de lignées cellulaires.

Pour introduire les polynucléotides ou les vecteurs dans une cellule hôte, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à différentes techniques, comme la technique de précipitation au phosphate de calcium (Graham et al., 1973 ; Chen et al., 1987), le DEAE Dextran (Gopal, 1985),
15 l'électroporation (Tur-Kaspa, 1896), la microinjection directe (Harland et al., 1985), ou encore les liposomes chargés en ADN (Nicolau et al., 1982, Fraley et al., 1979).

Le procédé selon l'invention trouve une application préférée pour l'insertion ciblée de l'acide nucléique d'intérêt dans une cellule bactérienne
20 ou dans une cellule de mammifère, humaine ou non-humaine.

Lorsque le procédé selon l'invention est mis en œuvre pour l'insertion ciblée d'un acide nucléique d'intérêt dans le génome d'une cellule de mammifère, en particulier dans une localisation prédéterminée du génome d'une cellule humaine, il s'intègre en tant qu'étape particulière de
25 réalisation d'un procédé de thérapie génique des cellules somatiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie (mutation, expression aberrante, etc) ou à assurer l'expression d'une protéine d'intérêt thérapeutique par introduction d'une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information génétique
30 peut être introduite soit *ex vivo* dans une cellule extraite de l'organe, la cellule modifiée étant alors réintroduite dans l'organisme, soit directement *in vivo* dans le tissu approprié. Dans ce second cas, différentes techniques

existent, parmi lesquelles des techniques diverses de transfection impliquant des complexes d'ADN et de DEAE-dextran (Pagano et al., 1967), d'ADN et de protéines nucléaires (Kaneda et al, 1989), d'ADN et de lipides (Felgner et al, 1987), l'emploi de liposomes (Fraley et al., 1980), etc. Plus récemment, l'emploi de virus comme vecteurs pour le transfert de gènes est apparu comme une alternative prometteuse à ces techniques physiques de transfection. A cet égard, différents virus ont été testés pour leur capacité à infecter certaines populations cellulaires. En particulier, les rétrovirus (RSV, HMS, MMS, etc), le virus HSV, les virus adéno-associés, et les adénovirus.

Selon encore un autre aspect préféré, les cellules transférées à l'étape b) du procédé de l'invention consistent en des cellules bactériennes, telles que *E. coli*.

Selon un autre aspect préféré, les cellules transfectées à l'étape b) du procédé de l'invention consistent en des cellules de mammifères non humains, telles que des cellules de souris ou de lapins, y compris les cellules souches embryonnaires de la lignée ES, ou encore des cellules de rats, de cobayes, de chiens ou de singes.

Selon un dernier aspect préféré de l'invention, les cellules transfectées à l'étape b) du procédé consistent en des cellules humaines, comme par exemple des cellules épithéliales, des cellules musculaires, des monocytes/macrophages ou encore des lymphocytes.

La présente invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, à la figure unique et aux exemples suivants.

La figure 1 illustre le schéma expérimental d'insertion d'un acide nucléique d'intérêt contenant le gène LacZ interrompu par un gène marqueur de résistance à la kanamycine dans le génome d'une cellule de *Escherichia coli*.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Construction du vecteur pCUL-lacZ ::kan

Le plasmide pCUL-LacZ ::kan a été construit à partir d'un dérivé du vecteur bien connu pUC8 (décrit par YANNISCH-PERRON et al., 1985) dans lequel l'origine de répllication ainsi que le gène LacZ' ont été retournés (vecteur pCUL-, cf Schumacher et al. 1998). Le gène LacZ a été obtenu par

traitement du plasmide Pbr329 à l'aide des endonucléases de restriction EcoRI « fill-in » et FspI . Le fragment de 3000 bp ainsi obtenu a ensuite été cloné dans les sites SapI (filled in) in FspI du vecteur pCUL-. Le plasmide résultant (pCUL-LacZ) contient l'origine de réplication Co1EI, le marqueur de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène lacZ en entier. Le gène de résistance à la Kanamycine, cloné par PCR à partir du vecteur pUC4k (Pharmacia) a été ensuite inséré au site EcoRV du plasmide pCUL-LacZ pour donner naissance au plasmide pCUL-LacZ ::kan utilisé dans la suite des expériences.

EXEMPLE 2 : Insertion ciblée, par recombinaison homologue, d'un acide nucléique d'intérêt dans un génome cellulaire

A. Matériel et Méthodes.

A.1 Traitement du vecteur par le N-AcO-AAF.

Mélange réactionnel :

- ADN plasmidique : concentration finale de 0,5µg/µl dans du tampon citrate 2×10^{-3} M, pH7.

- N-AcO-AAF : concentration finale de 400µg/ml dans de l'éthanol.

On ajoute 60 µg d'ADN dans 114 µl de tampon citrate 2×10^{-3} M pH7, additionnée de 3 µl d'éthanol à 100% ;

On préchauffe la solution à 37°C ;

puis on ajoute 3 µl de N-AcO-AAF (400 µg/ml) marqué au tritium (^3H).

Temps de réaction : 4, 8, 20 minutes.

On prélève 40 µl aux différents temps choisis. On arrête la réaction par une étape de précipitation de l'ADN avec 3 volumes d'éthanol/acétate de sodium à 0,16 M suivi de trois autres étapes de précipitation dans les mêmes conditions.

On détermine le pourcentage de bases modifiées en mesurant le nombre de moles de plasmide par spectrophotométrie UV et le nombre de moles d'AAF fixé, par comptage de la radioactivité β .

Le résultat est exprimé en pourcentage de bases modifié. Le temps de réaction est adapté en fonction de la taille du plasmide et du pourcentage de bases modifié souhaité.

A.2. Réalisation de la transfection des cellules de *E.coli*

Les cellules de *E.coli* sont transformées selon le procédé conventionnel d'électroporation en utilisant les conditions préconisées par les constructeurs des appareils prévu pour cet effet (Gene Pulser de Biorad par exemple).

A.3. Sélection des clones cellulaires recombinants

Dans l'exemple, les clones transformants sont sélectionnés sur milieu LB-agar contenant de la Kanamycine (20µg/ml) et l'absence d'activité β -galactosidase (se traduisant par des colonies blanches au lieu de bleues), phénotype caractéristique d'un événement de recombinaison non réciproque est visualisé grâce à la présence de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et d'IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) dans les boîtes.

B. RESULTATS

Les résultats sont représentés dans le tableau 1 ci-après.

TABLEAU 1

Nombre de lésions par plasmide	Fréquence de recombinaison : colonies blanches/colonies totales
OAAF	<0.0096 ^a 10426/0 ^b
10AA2F	0.056 17819/10
20AAF	0.17 9692/17
33AAF	0.32 2301975
43AAF	1.41 16554/237
67AAF	6.07 1934/125

^a fréquence de recombinaison homologue

^b nombre total de colonies/nombre de colonies recombinées.

Les résultats présentés dans le Tableau 1 ci-dessus montrent clairement que la fréquence de recombinaison homologue ciblée augmente en fonction du nombre de lésions produites par la modification chimique du plasmide (tableau 1). Ainsi, dans une souche sauvage pour les systèmes de recombinaison, alors que les événements spontanés de recombinaison

homologue représentent moins de 0,03% des événements de transformation, la présence de 67 lésions AAF sur ce plasmide conduit à l'obtention de plus de 6% de molécules recombinantes ciblées, soit une augmentation de plus de 1700 fois de la fréquence de recombinaison.

5 De plus, on a mis en évidence qu'avec le procédé de l'invention, le mécanisme conduisant au ciblage du gène est un mécanisme de recombinaison homologue non réciproque au cours duquel la molécule plasmidique est perdue. Ceci permet de réaliser un ciblage de gène très efficace en une seule étape. Chez *E. coli*, ce procédé a été utilisé pour
10 construire plus de dix souches dans lesquelles différents gènes ont été interrompus.

Ainsi, par exemple, ont été construites des souches dans lesquelles certains gènes impliqués dans la recombinaison (*recF*, *recG*, *dinG*), ont été interrompus par des gènes codant pour la résistance à des antibiotiques
15 comme la tétracycline ou le chloramphénicol. Ce ciblage de gène a été réalisé dans différents fonds génétiques comme par exemple dans des souches dont le système de réparation par excision (*uvrABC* dépendant) était inactivé.

REFERENCES

- Cappecchi, 1989, Science, vol. 244 : 1288
- Chen et al., 1987, Mol. Cell. Biol., 7 : 2745-2752.
- Fraley et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431
- 5 Flotte et al., 1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356.
- FUCHS R.P.P. J., 1984, Mol. Biol., 177(1): 173:180.
- Felgner et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 7413
- Fuller S.A. et al., 1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.
- 10 Graham et al., 1973, Virology, 52 : 456-457.
- Gopal, 1985, Mol. Cell. Biol., 5 : 1188-1190.
- Harland et al., 1985, J. Cell. Biol., 101 : 1094-1095.
- Kaneda et al., 1989, Science 243 : 375
- Lefèvre et al., 1978, Biochemistry, vol.17 : 2561-2567.
- 15 Luisi-De-Luca C, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.81 :2831-2835
- McLaughlin BA et al., 1996, *Am. J. Hum. Genet.*, 59 : 561-569.
- Nicolau C. et al., 1987, Methods Enzymol., 149:157-76.
- Nordeen SK et al., 1988, BioTechniques, 6 : 454-457
- Pagano et al., 1967, J.Virol. 1 : 891
- 20 Reid et al. , 1991, Molecular and Cellular Biology, vol. 11: 2769
- Samulski et al., 1989, *J. Virol.*, 63 : 3822-3828.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F., and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York.
- 25 Sternberg N.L., 1992, Trends Genet., 8 : 1-16.
- Sternberg N.L., 1994, Mamm. Genome, 5 : 397-404.
- SCHMID S E, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.79:4133(4137).
- Sambrook et Russel, Molecular Cloning, 2001, 3^{ème} édition, CSHL Press.
- Schumacher et al., 1998 [Référence à compléter S.V.P!].

Tur-Kaspa et al, 1986, Mol. Cell. Biol., 6 : 716-718.

Yannisch-Perron C. et al., 1985, Gene, 33:103-119.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome
5 contenu dans une cellule procaryote ou eucaryote.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'agent mutagène est choisi parmi le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF), un agent alkylant, le benzo(a) pyrene-diol-époxyde (BPDE) ou encore un rayonnement UV.

10 3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).

4. Procédé pour insérer *in vitro* un acide nucléique d'intérêt inclus initialement dans un polynucléotide, au sein d'une séquence nucléotidique prédéterminée présente dans un chromosome contenu dans une cellule
15 procaryote ou eucaryote, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de :

a) mettre en contact le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt avec un agent mutagène bloquant la réplication de l'ADN dans la cellule ;

20 b) transfecter des cellules procaryotes ou eucaryotes avec le polynucléotide tel qu'obtenu à la fin de l'étape a) ;

c) sélectionner les cellules procaryotes ou eucaryotes pour lesquelles l'acide nucléique d'intérêt a été intégré dans la séquence nucléotidique prédéterminée.

25 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre l'étape suivante :

d) sélectionner parmi les cellules procaryotes ou eucaryotes sélectionnées à l'étape c), les cellules dans lesquelles les séquences du polynucléotide, autres que celle de l'acide nucléique d'intérêt, ont été éliminées.

30 6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent mutagène est choisi parmi le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF), un agent alkylant, le benzo(a) pyrene-diol-époxyde (BPDE) ou encore un rayonnement UV.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que l'agent mutagène est le N-acétoxy-2-acétylamino fluorène (N-AcO-AAF).

8. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le N-AcO-AAF est mis en contact avec le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt à une concentration adaptée à la fixation d'au moins 10 molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide.

5

9. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la concentration de N-AcO-AAF est adaptée à la fixation d'au moins 50 molécules de N-AcO-AAF par molécule du polynucléotide.

10. Procédé selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt à insérer dans le génome de la cellule procaryote ou eucaryote, qui est inclus dans ledit polynucléotide, comprend respectivement, à son extrémité 5' et à son extrémité 3', des séquences ayant un haut degré d'identité avec les séquences correspondantes localisées aux extrémités 5' et 3' de l'ADN cible contenu dans le chromosome.

15

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que les séquences localisées respectivement à l'extrémité 5' et à l'extrémité 3' de l'acide nucléique d'intérêt sont identiques aux extrémités respectivement 5' et 3' de l'ADN cible contenu dans le chromosome.

20

12. Procédé selon l'une des revendications 4 à 11, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt inclus dans ledit polynucléotide comprend une séquence nucléotidique marqueur de sélection.

13. Procédé selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend un cadre de lecture ouvert codant une protéine d'intérêt thérapeutique.

25

14. Procédé selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend un cadre de lecture ouvert interrompu par une séquence nucléotidique hétérologue.

15. Procédé selon l'une des revendications 4 à 13, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt code pour un ARN antisens.

30

16. Procédé selon l'une des revendications 13 à 15, caractérisé en ce que l'acide nucléique d'intérêt comprend de plus une séquence nucléotidique à fonction de promoteur, fonctionnelle dans la cellule hôte procaryote ou eucaryote choisie, sous le contrôle de laquelle est placé le cadre de lecture ouvert ou l'ARN inclus dans ledit acide nucléique d'intérêt.

35

17. Procédé selon l'une des revendications 4 à 16, caractérisé en ce que le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt comprend une séquence nucléotidique marqueur localisée, dans ledit polynucléotide, en dehors de la séquence nucléotidique de l'acide nucléique d'intérêt.

5 18.. Procédé selon l'une des revendications 4 à 17, caractérisé en ce que le polynucléotide comprenant l'acide nucléique d'intérêt est un vecteur d'ADN.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le vecteur d'ADN est un plasmide bactérien.

10 20. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le vecteur d'ADN est un ADN linéaire double brin.

21. Procédé selon l'une des revendications 4 à 20 caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules bactériennes.

15 22. Procédé selon l'une des revendications 4 à 20, caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules de mammifère non humain.

20 23. Procédé selon l'une des revendications 4 à 20, caractérisé en ce que les cellules transfectées à l'étape b) consistent en des cellules humaines.

**Plasmide contenant le gene cible interrompu:
pCUL-LacZ::kan**

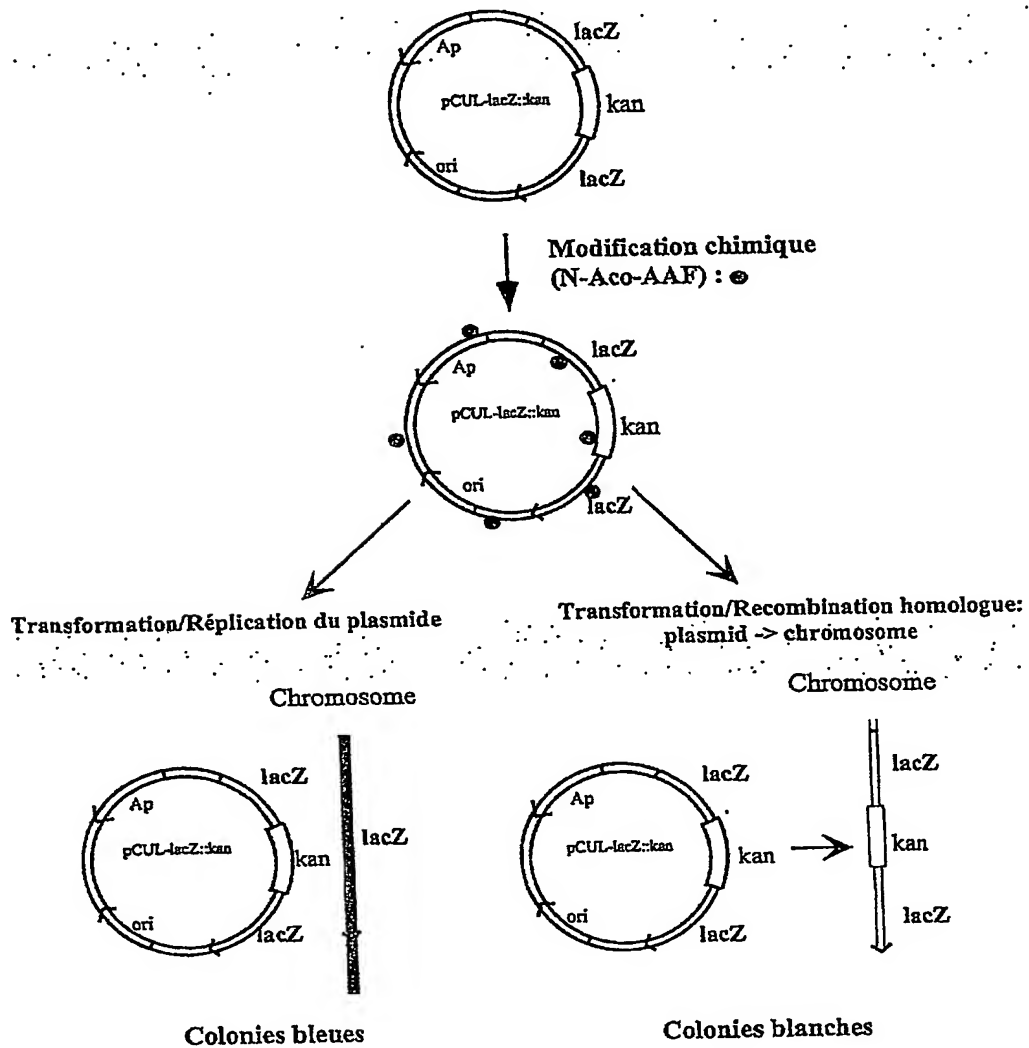
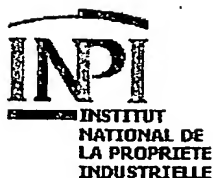


FIGURE 1




BREVET D'INVENTION

Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	N771FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0213474
TITRE DE L'INVENTION	
	PROCEDE POUR INSERER UN ACIDE NUCLEIQUE D'INTERET DANS UNE CELLULE PROCARYOTE OU EUCARYOTE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE.
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	Alain MICHELET
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	BICHARA
Prénoms	Marc Bernard
Rue	1, rue Lamartine
Code postal et ville	67550 VENDENHEIM
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	FUCHS
Prénoms	Robert P.P.
Rue	6A, rue Prosper Mérimée
Code postal et ville	67100 STRASBOURG
Société d'appartenance	
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE	PARIS, LE 26/11/02

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.


MICHELET Alain
C.P.I. bm (92-1176 i)
Cabinet HARLE & PHELIP

PCT Application
FR0303188

